

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 952**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2007 PCT/FI2007/050182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2007 WO07113388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2007 E 07730669 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2007910**

54 Título: **Método y micromatriz para detectar herpesvirus**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 788307 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.04.2017

73 Titular/es:

**MOBIDIAG OY (100.0%)
Mobidiag Oy
02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**JÄÄSKELÄINEN, ANNE, J.;
PIIPARINEN, HELI;
LAPPALAINEN, MAIJA y
VAHERI, ANTTI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 608 952 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y micromatriz para detectar herpesvirus

La presente invención está relacionada con un método y una micromatriz para detectar herpesvirus.

5 Los herpesvirus causan varias enfermedades humanas de importancia clínica. La infección o reactivación de virus del herpes simple tipo 1 o 2 (HSV-1, HSV-2), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la varicela zóster (VZV) o virus del herpes humano 6 (HHV-6) pueden dar especialmente como resultado enfermedades del sistema nervioso central (CNS) y complicaciones en pacientes inmunocomprometidos (Aurelius *et al.*, 1991; Koskiniemi *et al.*, 2002; Piiparinen *et al.*, 2002; Aalto *et al.*, 2003). Además del HHV-6, el virus del herpes humano 7 (HHV-7) se ha descrito como un agente causante de exantema súbito y se ha documentado como
10 causante de complicaciones severas en receptores de trasplantes (Tanaka *et al.*, 1994; Suga *et al.*, 1997). Para detectar infecciones por herpesvirus, actualmente se utilizan el aislamiento de virus, la detección de ácidos nucleicos y varios métodos serológicos (Chiu *et al.*, 1998; Pitkäranta *et al.*, 2000; Espy *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2001; Ihira *et al.*, 2002). Se han desarrollado ensayos de PCR múltiple para satisfacer la demanda de detección rápida de virus del herpes (Read y Kurtz, 1999; Aberle y Puchhammer-Stöckl, 2002; Druce *et al.*, 2002; Hudnall *et al.*, 2004). En
15 Yamamoto y Nakamura (2000) se describe un ensayo de PCR en un solo tubo para la amplificación simultánea de varios virus del herpes, y en Saffronetz *et al.* (2003) la diferenciación y cuantificación de herpesvirus humanos mediante PCR en tiempo real. US 2004/0110195 describe un método para detectar y clasificar herpesvirus humanos que implica el uso de ensayos de PCR múltiple y cebadores consenso para amplificar regiones conservadas del ADN de herpesvirus. US 20040053264 describe un método para la detección simultánea de organismos patógenos
20 que incluyen herpesvirus mediante el uso de un chip de ADN. US 20030228599 describe una técnica de análisis múltiple para cribar herpesvirus. US 20030143571 y Földes-Papp *et al.* (2004) describen un método para la detección simultánea de algunos herpesvirus utilizando una micromatriz. Striebel *et al.* (2004) describe estudios que conciernen al diagnóstico de herpesvirus humanos con micromatrices de ADN utilizando dendrímeros. En la publicación de Boriskin *et al.* (2004) se utilizaron micromatrices que utilizan sondas largas para detectar 13
25 patógenos diferentes incluyendo varios herpesvirus en infecciones del CNS.

Aunque en la técnica anterior se han descrito varios métodos para detectar varios herpesvirus, todavía se necesitan nuevos métodos mediante los cuales se podría mejorar la eficiencia y la velocidad de la detección de herpesvirus. También, únicamente unos pocos métodos hacen posible la detección simultánea de varios herpesvirus a partir de la
30 misma muestra biológica. En particular, únicamente algunas publicaciones describen un método que puede distinguir entre los virus HHV-6A y HHV-6B.

Los cebadores utilizados para amplificar algunos de los herpesvirus se conocen de US 6.897.057, JP 6253900 y Vesanen *et al.* (1996), Yamamoto y Nakamura (2000), Akhtar *et al.* (1996), Van den Veyver *et al.* (1998), WO 9325707, US 20040110195 y Saffronetz *et al.* (2003). La secuencia del promotor de la ARN polimerasa T3 utilizada en la amplificación de ácidos nucleicos específicos se conoce de JP2001095590, EP 510085 y US 2004/0125774.

35 Compendio

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método nuevo y mejorado para detectar herpesvirus.

En particular, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método eficiente y rápido para la detección de uno o más herpesvirus a partir de la misma muestra biológica y/o a partir de diferentes muestras biológicas. Más
40 específicamente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método, el cual hace posible la detección rápida y eficiente de varios herpesvirus simultáneamente.

Esta invención tiene también como objetivo aportar una micromatriz para la detección eficiente y rápida de herpesvirus.

La presente invención consigue éstos y otros objetos, junto con las ventajas de los mismos sobre los métodos conocidos y micromatrices, tal y como se describe y reivindica más adelante en la presente memoria.

45 El método de esta invención se basa en la tecnología de micromatriz. De acuerdo con el método, se pueden detectar simultáneamente varios herpesvirus diferentes a partir de la misma y/o diferentes muestras biológicas. El método también permite estudiar varias muestras al mismo tiempo. También es posible determinar el genotipo de los virus en la misma reacción.

De acuerdo con una realización de la invención, el método de la invención comprende las siguientes etapas de:

- 50
- extraer ADN de una muestra biológica;
 - amplificar el ADN extraído;
 - traducir el ADN amplificado a ARN de cadena simple;

- hibridar los ARN de cadena simple con secuencias de oligonucleótidos en una placa de micromatriz, correspondiéndose dichas secuencias de oligonucleótidos con cada uno de los herpesvirus que han de ser detectados;

5 - extender el ARN de cadena simple hibridado mediante el método de extensión de cebador en presencia de nucleótidos detectables, y

- detectar una señal de los nucleótidos detectables mediante un método adecuado.

Más específicamente, el método se caracteriza por lo que se enuncia en las reivindicaciones 1 a 11 y 24.

De acuerdo con otra realización de la invención, una micromatriz para detectar herpesvirus comprende:

- un soporte sólido que comprende al menos una matriz; y

10 - comprendiendo dicha matriz oligonucleótidos específicos para al menos un herpesvirus.

Más específicamente, la micromatriz se caracteriza por lo que se enuncia en las reivindicaciones 12 a 17 y un método para preparar una micromatriz para detectar herpesvirus se caracteriza por lo que se enuncia en la reivindicación 19.

15 Un kit de micromatriz se caracteriza por lo que se enuncia en la reivindicación 18 y un oligonucleótido se caracteriza por lo que se enuncia en la reivindicación 20, un par de cebadores se caracterizan por lo que se enuncia en la reivindicación 21, y un conjunto de pares de cebadores de PCR múltiple se caracteriza por lo que se enuncia en las reivindicaciones 22 y 23.

20 Las PCRs de diagnóstico se realizan comúnmente para un herpesvirus cada vez y esto incrementa el tiempo de detección para varios herpesvirus. Con PCRs se pueden perder infecciones dobles y triples mientras que se pueden detectar infecciones múltiples en un día mediante micromatriz. La detección simultánea de varios herpesvirus es muy ventajosa. De acuerdo con una realización preferida de la invención, bajo condiciones adecuadas, se encontró que la especificidad del método de micromatriz de la presente invención fue de hasta el 100%. La detección basada en micromatriz ofrece un protocolo rápido y conveniente para detectar varios herpesvirus con propósitos tanto diagnósticos como de investigación. El método es en particular adecuado para la detección cualitativa de herpesvirus.

Descripción de las figuras

30 Fig. 1. Identificación de ocho herpesvirus mediante un método basado en micromatriz que utiliza la toma de imágenes. Se situaron en puntos sonda todos los oligonucleótidos específicos de herpesvirus en 2xtriplicado por matriz y los oligonucleótidos no específicos dos veces por matriz. Cada matriz contenía 60 puntos sonda (matriz de 5x12). No se observaron señales de oligonucleótidos no específicos. Estas imágenes de HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, HHV-7 y VZV fueron de niveles promedio de controles de ADN viral (área de intervalo 1.000-5.000 copias o VPs). En las imágenes de HHV-6A y -6B no se observaron reacciones cruzadas en niveles bajos de ADN viral (niveles en imagen: 290 copias y 220 VPs, respectivamente).

Descripción detallada de la invención

35 Los "herpesvirus" pertenecen a la familia *Herpesviridae*. Están compuestos por un núcleo de ADN de doble cadena dentro de una cápside icosaédrica y una bicapa de fosfolípidos.

40 De los más de 100 herpesvirus conocidos, ocho infectan a humanos. Los herpesvirus humanos se clasifican en tres subfamilias – alfa-, beta- y gamma-herpesvirus – en base a la longitud del ciclo de replicación vírica y el rango de tejidos del hospedador. El virus del herpes simple 1 (HSV-1), el virus del herpes simple 2 (HSV-2) y el virus de la varicela zóster (VZV) pertenecen a la subfamilia alfa, los citomegalovirus (CMV), herpesvirus 6 (HHV-6) y los herpesvirus 7 (HHV-7) pertenecen a la subfamilia beta y los virus de Epstein-Barr (EBV) y los herpesvirus (HHV-8) pertenecen a la subfamilia gammaherpesvirus. Las infecciones humanas son muy comunes y los pacientes se pueden infectar con uno o más herpesvirus, por ejemplo con ambos HSV-1 y HSV-2.

45 Mediante el método de la presente invención es posible detectar uno o más de una cantidad de herpesvirus en una muestra biológica. Preferiblemente, los virus se seleccionan del grupo que comprende HSV-1, HSV-2, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la varicela zóster (VZV), virus del herpes humano 6 (HHV-6A y HHV-6B) y virus del herpes humano 7 (HHV-7). En particular, mediante el método de la presente invención se puede hacer una distinción entre HHV-6A y HHV-6B.

50 Más específicamente, mediante el método de la presente invención es posible detectar simultáneamente al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro herpesvirus diferentes a partir de la misma muestra.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, mediante el método de la presente invención se detectan simultáneamente herpesvirus clasificados en la misma subfamilia, alfa-, beta- o gamma-.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, mediante el método de la presente invención se detectan herpesvirus que causan comúnmente una infección doble o triple en un paciente.

5 Además, se pueden detectar simultáneamente otros patógenos que comúnmente causan infecciones al mismo tiempo que los herpesvirus.

En la presente memoria, por "muestra biológica" se quiere decir cualquier muestra de origen biológico. En particular, la muestra es una muestra clínica de un sujeto, preferiblemente de un sujeto humano. La muestra puede comprender sangre completa, plasma, una muestra de fluido cerebroespinal (CSF), biopsia, orina, heces, esputo, mucosidad, médula ósea, piel, pelo, uñas, un frotis de una lesión o úlcera, un frotis cervical/vaginal, un frotis nasofaríngeo, un lavado broncoalveolar, un aspirado endotraqueal o cualquier otra muestra clínica. Las muestras clínicas preferidas son muestras de plasma, de sangre completa y de fluido cerebroespinal (CSF).

El método de la presente invención comprende que se extraiga el ADN de la muestra biológica a estudiar. Se puede extraer el ADN de la muestra biológica utilizando métodos conocidos de extracción de ADN. En la extracción se puede utilizar por ejemplo kits disponibles comercialmente, tales como el instrumento MagNA Pure LC y el Total Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Basel, Suiza), el High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) o la extracción de fenol-cloroformo.

El ADN extraído se puede amplificar entonces utilizando un método adecuado. Preferiblemente, el método de amplificación es un método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). PCR hace referencia al método para incrementar la concentración de un segmento de una secuencia objetivo en una mezcla de ADN sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia objetivo consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia objetivo, seguido por una secuencia precisa de ciclos térmicos en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia objetivo de doble cadena. En este caso, la secuencia objetivo es una secuencia del virus del herpes que ha de ser detectado. También puede ser una secuencia de otro patógeno que ha de ser detectado. Como los segmentos amplificados deseados de la secuencia objetivo se convierten en las secuencias predominantes (en términos de concentración) en la mezcla, se dice que son "amplificadas por PCR".

Los cebadores para la PCR se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y descritos, p. ej., en Sambrook, J. Fritsch, E. F., y Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). El par de cebadores consiste típicamente en un cebador directo (sentido) y un cebador inverso (antisentido) que se corresponden con las áreas específicas de una secuencia de herpesvirus a detectar. El par de cebadores se puede diseñar utilizando software disponible comercialmente destinado al diseño de cebadores, por ejemplo el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen y Skaletsky, 2000) y el software mfold para ADN (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>; Zuker, 2003).

La amplificación del ADN de la muestra se puede hacer en una o varias reacciones de amplificación mediante PCR. Si se utiliza más de un par de cebadores en la PCR, el método se llama PCR múltiple. Es posible amplificar el ADN en una o más PCRs múltiples. Por ejemplo, en la presente memoria se describe la amplificación de pares de cebadores para dos o más herpesvirus en una PCR múltiple y pares de cebadores para otros dos o más herpesvirus en otra PCR múltiple. Si se ha amplificado el ADN de una muestra en más de una reacción de PCR, los productos de PCR de reacciones diferentes se pueden combinar antes de llevar a cabo más etapas.

Tal y como se describe en la presente memoria, se diseña un par de cebadores para cada herpesvirus que ha de ser detectado. El par de cebadores comprende cebador A y cebador B, en donde ventajosamente

A es SEQ ID NO: 1 y B es SEQ ID NO: 3;

45 A es SEQ ID NO: 6 y B es SEQ ID NO: 7;

A es SEQ ID NO: 9 y B es SEQ ID NO: 10;

A es SEQ ID NO: 12 y B es SEQ ID NO: 13;

A es SEQ ID NO: 15 y B es SEQ ID NO: 16; o

A es SEQ ID NO: 19 y B es SEQ ID NO: 20.

50 De acuerdo con una realización preferida de la invención, en lugar de SEQ ID NO: 1 se puede utilizar SEQ ID NO: 22 y en lugar de SEQ ID NO: 3 se puede utilizar SEQ ID NO: 23. Estas secuencias se pueden utilizar además de las secuencias originales.

El cebador A es preferiblemente un cebador directo y el cebador B es preferiblemente un cebador inverso.

Se debe entender que las secuencias de cebadores equivalentes comprenden secuencias, que tienen al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97% de identidad con las secuencias de los pares de cebadores A o B mencionadas anteriormente. Más preferiblemente, las secuencias tienen al menos 99% de identidad, más preferiblemente 100% de identidad con las secuencias mencionadas. En particular puede haber diferencias en los extremos 5' de los cebadores.

“Secuencia de cebador que tiene esencialmente la misma secuencia” hace referencia a una secuencia de cebador que carece de un nucleótido, que tiene un nucleótido adicional, o que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos comparada con las secuencias de cebadores SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23. También puede ser ventajoso si hay variaciones de ácidos nucleicos, por ejemplo T/C, en cebadores (ambos cebadores alternativos disponibles en la misma mezcla).

Los cebadores utilizados en la presente memoria hacen referencia a cebadores que tienen una secuencia contigua de 10 a 50 nucleótidos, preferiblemente 20 a 40, más preferiblemente 20 a 30 nucleótidos. Los cebadores utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR incluyen secuencias de nucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada como para proporcionar la iniciación de la polimerización de una molécula de ácido nucleico.

En particular, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 para amplificar HSV-1 y HSV-2, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 para amplificar VZV, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para amplificar CMV, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 para amplificar EBV, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 para amplificar HHV-6, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 para amplificar HHV-7. De acuerdo con una realización alternativa y preferida de la invención, se ha diseñado el par de cebadores SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23 para amplificar HSV-1 y HSV-2.

La reacción de amplificación por PCR se realiza bajo condiciones adecuadas para la función de la ADN polimerasa en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción comprende ADN polimerasa, todos los cuatro nucleótidos trifosfato (NTPs), un tampón adecuado y opcionalmente sales u otros reactivos. La amplificación puede consistir, por ejemplo, en una desnaturalización a aproximadamente 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 93 – 97°C, preferiblemente 96°C durante 10 segundos, 50 – 60°C, preferiblemente 55°C durante 20 segundos y aproximadamente 69 – 74°C, preferiblemente 72°C durante 20 segundos y una extensión final a 69 – 74°C, preferiblemente 72°C durante 5 minutos.

Alternativamente, la amplificación puede consistir, por ejemplo, en una desnaturalización a aproximadamente 95°C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos a 93 – 97°C, preferiblemente 96°C durante 10 segundos, 45 – 70°C, preferiblemente 65°C durante 20 segundos (una disminución de 0,5°C por ciclo) y aproximadamente 69 – 74°C, preferiblemente 72°C durante 20 segundos, 10 ciclos a 93 – 97°C, preferiblemente 96°C durante 10 segundos, 55 – 65°C, preferiblemente 60°C durante 20 segundos y una extensión final a 69 – 74°C, preferiblemente 72°C durante 5 minutos.

La longitud del ADN amplificado (amplicones) es preferiblemente entre 150 a 250 pb, más preferiblemente 170 a 230 pb.

Una vez se ha amplificado el ADN de la muestra, los productos se convierten preferiblemente en ácidos nucleicos de cadena simple, preferiblemente se transcriben en ARN de cadena simple. Para facilitar esta etapa del protocolo, uno de los cebadores del par de cebadores puede incluir un promotor de polimerasa de la polimerasa utilizada en la reacción. De acuerdo con esta descripción, se incluyó el promotor de la ARN polimerasa T3 en los cebadores inversos. Si se incluye un promotor de polimerasa en el cebador, la longitud del cebador se puede doblar. De acuerdo con esta descripción, el cebador para el promotor de la ARN polimerasa T3 comprende preferiblemente la SEQ ID NO: 2. La reacción de transcripción se puede realizar utilizando kits disponibles comercialmente, tales como AmpliScribe™ T3 High Yield Transcription Kit (Epicentre, Madison, WI) o alternativamente AmpliScribe™ T3-Flash™ Transcription Kit (Epicentre, Madison, WI).

Se hibrida ARN de doble cadena bajo condiciones adecuadas con secuencias de oligonucleótidos en una placa de micromatriz, correspondiéndose dichas secuencias de oligonucleótidos con cada uno de los herpesvirus que han de ser detectados.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “micromatrices” hace referencia a matrices que comprenden distintos oligonucleótidos sintetizados sobre un sustrato, tal como un portaobjetos de cristal, silicona, plástico, una matriz de polímero o cualquier otro soporte sólido adecuado. La micromatriz se puede preparar y utilizar de acuerdo con métodos conocidos para un experto en la técnica. El soporte sólido puede ser p. ej. un portaobjetos de microscopio de cristal o un cristal recubierto por silano. El portaobjetos de cristal se recubre preferiblemente con isotiocianato para que los oligonucleótidos de ADN aminados se puedan enlazar covalentemente con el cristal (Lindroos *et al.* 2001).

Se pueden diseñar oligonucleótidos para herpesvirus utilizando un software adecuado, tal como el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen y Skaletsky, 2000) y el software mfold para ADN

- (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>; Zuker. Los oligonucleótidos se unen al soporte sólido mediante un método adecuado. Los oligonucleótidos se pueden p. ej. modificar para comprender un grupo amino en su extremo 5', el cual se puede enlazar covalentemente con la capa de silano – isotiocianato sobre el soporte sólido. El oligonucleótido se puede unir a través de su extremo 5' a la superficie de cristal recubierta de 3'-amino-propiltrimetoxisilano + 1,4-fenilenedi-isotiocianato mediante la formación de un enlace covalente. Los oligonucleótidos también comprenden preferiblemente un cebador poli (T) (espaciador T) en su extremo 5' antes de la secuencia de oligonucleótidos específica. La longitud del espaciador T puede ser 6 a 12, preferiblemente 8 a 10, típicamente 9 nucleótidos. También se pueden utilizar portaobjetos de cristal de micromatriz con una superficie química adecuada disponibles comercialmente, tales como portaobjetos de micromatriz SAL-1, Asper Biotech.
- 5
- 10 Los oligonucleótidos tal y como se utilizan en la presente memoria hacen referencia a oligonucleótidos que tienen una secuencia contigua con una longitud de aproximadamente 10 – 50 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente 15 – 30, típicamente más cortas que 30 nucleótidos. Más preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de aproximadamente 15 – 25 nucleótidos, más preferiblemente 16 a 23. Típicamente pueden tener una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos.
- 15 Los oligonucleótidos unidos a la micromatriz incluyen secuencias de nucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada como para proporcionar la hibridación de ARN de cadena simple de los herpesvirus analizados en la muestra.
- Los oligonucleótidos se pueden situar en puntos sonda en el soporte sólido mediante un método adecuado, por ejemplo mediante un preparador de micromatrices disponible comercialmente tal como OmniGrid®, GeneMachines, Huntingdon, R.U. La matriz puede consistir en una matriz que comprende los oligonucleótidos para los herpesvirus que han de ser detectados. La matriz también puede consistir en oligonucleótidos con secuencias inespecíficas para virus como un control. Adicionalmente, la matriz también puede consistir en oligonucleótidos con secuencias específicas para otros patógenos que no son herpesvirus. El soporte sólido puede contener 1 a 80, preferiblemente 10 a 60 matrices. Esto quiere decir que en el mismo soporte sólido se pueden estudiar simultáneamente hasta 80 muestras.
- 20
- 25 El número de puntos sonda en una matriz es 4 a 200, preferiblemente 10 a 100, más preferiblemente 20 a 50, típicamente 30 a 40. Los puntos sonda pueden consistir en los oligonucleótidos por duplicado o triplicado. Pueden consistir en p. ej. 10 a 25, típicamente 15 – 20 oligonucleótidos por duplicado.
- La cantidad de oligonucleótido por punto puede ser 0,5 a 1,5 pmol, típicamente aproximadamente 1 pmol.
- 30 Puede haber aproximadamente 200 puntos sonda por micromatriz y el número de puntos sonda por soporte sólido, por ejemplo un portaobjetos, puede ser aproximadamente 16.000.
- Se hibrida el ARN de cadena simple con los oligonucleótidos y se realiza una reacción de extensión de cebador bajo condiciones adecuadas. La temperatura de hibridación puede ser 40 a 45°C, preferiblemente aproximadamente 42°C. El tiempo de hibridación puede ser aproximadamente 15 a 30 minutos. La hibridación se puede realizar en concentraciones de sal variables, por ejemplo en cantidades variables de NaCl.
- 35
- La reacción de extensión de cebador se realiza en la presencia de una enzima transcriptasa reversa y nucleótidos trifosfato, opcionalmente con otros tampones adecuados, sales y otros reactivos. La reacción se puede realizar a una temperatura de al menos 42°C, preferiblemente a una de 49 – 55°C, más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 52°C. La reacción se puede realizar en 15 a 30 minutos, preferiblemente aproximadamente 20 minutos. La mezcla de reacción comprende preferiblemente nucleótidos detectables, tales como nucleótidos fluorescentes, cuya señal se puede detectar mediante un método adecuado.
- 40
- Los nucleótidos detectables pueden comprender cualquier fragmento reportero o señal detectable incluyendo, pero no limitados a radioisótopos, enzimas, antígenos, anticuerpos, reactivos espectrofotométricos, reactivos quimioluminiscentes, fluorescentes y cualquier otra sustancia química productora de luz.
- 45 Las micromatrices se pueden analizar mediante un método adecuado, tal como un escáner ScanArray Express, software ScanArray™ y QuantArray™ (PerkinElmer, Wellesley, MA). Se puede comparar la señal del punto sonda de oligonucleótido (menos la señal de fondo local) con las señales de oligonucleótidos inespecíficos. El nivel o cantidad de las señales se ajusta para un resultado positivo o negativo. De acuerdo con esta descripción, las señales al menos tres veces más altas se consideraron positivas.
- 50 Los oligonucleótidos comprenden preferiblemente una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de secuencias:
- Las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 21. De acuerdo con una realización preferida de la invención, en lugar de la secuencia SEQ ID NO: 4 se puede utilizar SEQ ID NO: 24, en lugar de la secuencia SEQ ID NO: 5 se pueden utilizar SEQ ID NO: 25 o las
- 55 secuencias de oligonucleótidos generales SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 o varias de ellas y en lugar de la secuencia SEQ ID NO: 8 se pueden utilizar las secuencias SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29 o ambas. Las

secuencias de oligonucleótidos alternativas se pueden utilizar también en adición a (o junto con) las secuencias de oligonucleótidos originales.

5 Se debe entender que las secuencias de oligonucleótidos equivalentes comprenden secuencias, que tienen al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97% de identidad con las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29. Más preferiblemente las secuencias tienen al menos 99% de identidad, más preferiblemente 100% de identidad con las secuencias mencionadas. Si hay diferencias en la secuencia, las diferencias pueden estar preferiblemente en el extremo 5' del oligonucleótido.

10 "Secuencia de oligonucleótidos que tiene esencialmente la misma secuencia" hace referencia a una secuencia de oligonucleótidos que comprende una secuencia que carece de un nucleótido, que tiene un nucleótido adicional, o que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos comparada con las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

15 Se pueden añadir nucleótidos adicionales a cualquier extremo de la secuencia del oligonucleótido definida anteriormente. Sin embargo, esto puede resultar en estructuras secundarias, que pueden causar una hibridación menos exitosa. Se pueden diseñar los oligonucleótidos para que su temperatura de fusión, T_m , sea 49 a 54°C. Dependiendo de la temperatura, debería haber un número menor o mayor de nucleótidos libres en el extremo 5' del oligonucleótido. De acuerdo con esta descripción, el extremo 5' comprende un espaciador T. El extremo 5' del oligonucleótido puede comprender 1 o 2 nucleótidos adicionales además del espaciador T. Sin embargo, es ventajoso si el extremo 5' no comprende ningún nucleótido adicional. El extremo 5' también puede carecer de 1 o 2 nucleótidos. Sin embargo, es ventajoso si el extremo 5' no carece de ningún nucleótido.

25 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la micromatriz comprende oligonucleótidos que se corresponden con al menos dos, preferiblemente al menos tres herpesvirus diferentes, más preferiblemente al menos cuatro herpesvirus diferentes. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la micromatriz comprende oligonucleótidos que se corresponden con de 2 a 8 herpesvirus diferentes. De acuerdo con las realizaciones más preferidas, la micromatriz comprende oligonucleótidos que se corresponden con al menos cinco, preferiblemente al menos seis, más preferiblemente al menos siete o al menos ocho herpesvirus diferentes. Solamente unas pocas publicaciones describen métodos, mediante los cuales es posible la detección de siete u

30 ocho herpesvirus diferentes. Muy pocos métodos hacen posible la detección de los virus HHV-6A y HHV-6B. Es particularmente ventajoso que se puedan detectar simultáneamente todos los 8 herpesvirus mencionados a partir de la misma muestra biológica.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, para detectar herpesvirus simultáneamente se utilizan al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8.

35

Alternativamente, al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 o al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29.

40

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, para detectar herpesvirus simultáneamente se utilizan al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, o al menos oligonucleótidos que comprenden secuencias seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 21.

45 De acuerdo con una realización preferida de la invención más, el método de la presente invención detecta simultáneamente oligonucleótidos que comprenden secuencias que detectan herpesvirus que causan comúnmente una infección doble o triple en un paciente.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención más, el método comprende la detección de otros patógenos y otros virus a partir de la misma muestra biológica. Los otros patógenos o virus pueden ser aquellos que causan comúnmente infecciones al mismo tiempo que los herpesvirus. Alternativamente, los otros patógenos o virus pueden ser aquellos que causan trastornos del sistema nervioso central o enfermedades de deficiencia inmune. Enterovirus o patógenos que causan borreliosis son ejemplos de otros posibles patógenos.

50

La presente invención proporciona también un kit de micromatriz, que comprende la micromatriz y opcionalmente los reactivos necesarios en la reacción. Dichos reactivos son por ejemplo enzimas, nucleótidos trifosfato (NTPs) y

55

En la presente memoria "qPCRs" significa PCR cuantitativa.

En la presente memoria “PCR cualitativa” significa PCR de diagnóstico.

El método de la presente invención se ha ejemplificado en la presente memoria designando una micromatriz para la detección de ocho herpesvirus. Se comparó la detección basada en micromatrices con PCRs de diagnóstico rutinarias. Las PCRs de diagnóstico rutinarias se ejemplificaron preparando dos PCRs múltiples.

5 Los especímenes clínicos representaron casos de pacientes reales. Se obtuvieron resultados concordantes de PCRs y micromatrices en un 89%. La micromatriz dio resultado positivo en cuatro casos mientras que la PCR de diagnóstico fue negativa.

10 Hubo dos infecciones dobles (CMV-EBV) entre los especímenes de plasma positivos para CMV detectados mediante micromatriz. Estos especímenes eran de pacientes de trasplante renal y de médula ósea. Ambos pacientes eran seropositivos para EBV y CMV. Entre los especímenes positivos para EBV detectamos dos infecciones dobles (EBV-CMV y EBV-HHV-7) con micromatriz. La infección conjunta EBV-CMV era de un paciente con médula ósea trasplantada, quien fue seropositivo para EBV y tenía anticuerpos IgM e IgG para CMV. En el caso de la infección EBV-HHV-7, la muestra de un paciente de trasplante renal fue seronegativa para HHV-7.

15 Dos muestras de CSF positivas para VZV fueron positivas para VZV-HHV-6B y VZV-EBV mediante micromatriz. Estudios anteriores habían mostrado que el paciente positivo para VZV-HHV-6B también tenía anticuerpos intratecales contra VZV y HHV-6. En la posible infección conjunta VZV-EBV, se verificó IgG para VZV en el suero. Se encontró una posible triple infección (HSV-2, HHV-7 y HHV-6B) mediante micromatriz. La muestra fue seronegativa para HHV-7 y negativa en el ensayo contra HSV-1 y -2 mediante PCR de diagnóstico.

20 Los valores de recuento de células, proteínas y glucosa en el CSF estuvieron disponibles para solamente 3 pacientes positivos para VZV y 1 paciente positivo para HSV-2. En dos de éstos, los valores hallados fueron normales, mientras que otros dos mostraron recuentos elevados de leucocitos y eritrocitos, valores de glucosa normales y niveles de proteína elevados. El paciente positivo para HSV-2 también tuvo anticuerpos HSV-IgM en el CSF.

25 En diagnósticos no se realizan análisis de especímenes clínicos para HHV-7 mediante PCR. Cuatro especímenes, que fueron positivos para HHV-7 mediante micromatriz, fueron seronegativos para HHV-7 en el momento de la toma de muestras. Por lo tanto, no se pueden descartar infecciones agudas. HHV-7 se encuentra muy comúnmente, p. ej. en pacientes de trasplante (Dockrell *et al.*, 2001).

30 Comúnmente se realizan PCRs de diagnóstico para un herpesvirus a la vez y esto incrementa el tiempo de detección para varios herpesvirus. Se pueden perder infecciones dobles o triples con PCRs mientras que se pueden detectar infecciones múltiples mediante micromatriz en un día. Concluimos que la detección basada en micromatrices ofrece un protocolo rápido y conveniente para la detección de varios herpesvirus para propósitos tanto diagnósticos como de investigación.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 ADN viral y especímenes clínicos

Se utilizaron diluciones decimales en serie de controles comerciales de ADN vírico (comenzando por un millón de copias o partículas víricas) y sobrenadantes de cultivo celular para preparar las PCRs múltiples y la micromatriz (Tabla I).

40 TABLA I. Lista de controles comerciales de ADN vírico (Autogen Bioclear, Wiltshire, R.U.) y sobrenadantes celulares utilizados para la optimización y la prueba de PCR múltiple y micromatriz.

Virus	Cepa	Calidad de la muestra
HSV-1	MacIntyre	ADN vírico comercial
HSV-2	G	
CMV	AD169	
EBV	B95-8	
HHV-7	H7-4	
HHV-6A	U1102	
HHV-6B	Z-29	

ES 2 608 952 T3

Virus	Cepa	Calidad de la muestra
VZV	Rodstrain	
HHV-6A	Control interno*	Sobrenadante celular
	GS	
HHV-6B	Z-29	

* Aislado clínico utilizado como control interno.

5 En total, se recolectaron 116 especímenes clínicos de material clínico analizado previamente que contenían plasma (73), sangre completa (10), muestras de fluido cerebroespinal (CSF) (23) y muestras de ensayos de aptitud (10) (QCMD, Glasgow, Escocia, R.U.). Las muestras de plasma, sangre completa y CSF se recolectaron de pacientes de trasplante de órgano sólido y médula ósea, y de pacientes con síntomas neurológicos. De las muestras de ensayos de aptitud, 4/10 derivaban de un programa de aptitud de VZV y 6/10 de un programa de aptitud de HSV del 2004 (Tabla II). Para estudiar la especificidad de la micromatriz, realizamos ensayos a 70 sueros de pacientes (posible neuropatía epidémica), 30 CSF que fueron negativos en el ensayo para ADN de HSV, EBV, CMV, VZV, HHV-6 y -7, y 11 muestras (Tabla II) de un programa de aptitud de enterovirus del 2004.

10 TABLA II. Programas de aptitud de virus, cepas, cargas de ADN vírico y formatos de panel para muestras de ensayos de aptitud utilizadas para probar la micromatriz.

Programa de aptitud de virus	Cepa	Carga de ADN vírico (GEq/ml)	Formato de panel
Virus de la varicela-zóster, 2004	VZV cepa 9/84 SMI	700	VZV cultivado liofilizado
		70.000	
		7.000.000	
Virus del herpes simple, 2004	HSV-1 ATCC cepa MacIntyre	210.000.000	Muestras inactivadas por deshidrocongelación
	HSV-1 ATCC cepa MacIntyre	24.000	
	HSV-2 ATCC cepa MS	1.500	
		15.000	
		15.000.000	
Enterovirus, 2004*	VZV cepa 9/84 SMI	500.000	EV cultivado liofilizado
	neg	-	
	Serotipos seleccionados EV	-	

GEq/ml, genoma equivalente por ml; neg, negativo; EV, enterovirus. Todas las muestras de ensayos de aptitud se diluyeron en agua estéril (1 ml).

15 *Once muestras de ensayos de aptitud de enterovirus contenían enterovirus (8/11), rinovirus (1/11) y 2 fueron negativas.

Extracción de ADN

20 Se extrajo ADN utilizando un instrumento MagNA Pure LC y Total Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics, Basel, Suiza), High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) o extracción de fenol-cloroformo dependiendo del protocolo utilizado en diagnóstico.

Cebadores de PCR múltiple y oligonucleótidos

Se modificó el par de cebadores para HSV-1 y -2 (PCR múltiple 1) a partir de cebadores publicados (Piiparinen y Vaheri, 1991). Se diseñaron oligonucleótidos y cebadores para CMV, EBV, VZV, HHV-6A, -6B y HHV-7 (PCR múltiple 2) utilizando el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen y Skaletsky, 2000) y el software mfold para ADN (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>; Zuker, 2003). Se incluyó la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T3 en los cebadores inversos de PCR múltiple (Tablas III y IV).

Alternativamente, se diseñaron oligonucleótidos y cebadores para HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV, HHV-6A, -6B y HHV-7 (PCR múltiples 1 y 2) utilizando el software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Rozen y Skaletsky, 2000) y el software mfold para ADN (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>; Zuker, 2003). Las secuencias alternativas en la Tabla III son SEQ ID NO: 22 a 26. Las secuencias alternativas en la Tabla IV son SEQ ID NO: 28 y 29.

Tabla III. Cebadores utilizados para la PCR múltiple 1 y oligonucleótidos en la micromatriz.

Género, Nº de registro de GenBank	Oligonucleótidos	Nombre del gen	Secuencias (5' → 3')	Posición
HSV-1, X14112	HSV-FW	ADN pol., UL30	AAGGAGGCGCCCAAGCGCCCG (SEQ ID NO: 1)	64.750 – 64.768
			AGCGAATTCGAGATGCTG(T/C)T (SEQ ID NO: 22)	64.130 – 64.149
	HSV-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			TGGGGTACAGGCTGGCAAAGT (SEQ ID NO: 3)	64.976 – 64.956
			CCTT(T/G)ATCTTGCTGCGCTTC (SEQ ID NO: 23)	64.355- 64.336
	HSV-1-T3		Am-TTTTTTTTTTGTCTTGACCCCACTT (espaciador + SEQ ID NO: 4)	64.907 – 64.922
			Am- TTTTTTTTTCAAGCTGACGGACATT (espaciador + SEQ ID NO: 24)	64.237 – 64.252
HSV-2, Z86099	HSV-FW	ADN pol., UL30	AAGGAGGCGCCCAAGCGCCCG (SEQ ID NO: 1)	65.209 – 65.229
			AGCGAATTCGAGATGCTG(T/C)T (SEQ ID NO: 22)	64.591 – 64.610
	HSV-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			TGGGGTACAGGCTGGCAAAGT (SEQ ID NO: 3)	65.449 – 65.429
			CCTT(T/G)ATCTTGCTGCGCTTC (SEQ ID NO: 23)	64.816 – 64.797
	HSV-2-T3		Am- TTTTTTTTTAGGATAAGGACGACGAC (SEQ ID NO: 5)	65.279 – 65.295
			Am- TTTTTTTTTCAAGCTGACGGAGATC (SEQ ID NO: 25)	64.698 – 64.713

ES 2 608 952 T3

Género, Nº de registro de GenBank	Oligonucleótidos	Nombre del gen	Secuencias (5' → 3')	Posición
HSV (HSV-1, X14112; HSV-2, Z86099)	HSV-GEN1-T3		Am- TTTTTTTTTGGTACAACATCATCAACTT C (SEQ ID NO: 26)	HSV-1: 64.197 – 64.216; HSV-2: 64.658 – 64.677
	HSV-GEN2-T3		Am- TTTTTTTTTGGGACATAGGCCAGAG (SEQ ID NO: 27)	HSV-1: 64.311 – 64.326; HSV-2: 64.722 – 64.787

5 FW, cebador directo (sentido); RV, cebador inverso (antisentido, secuencia del promotor de la ARN polimerasa T3 AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA antes de la secuencia del virus); T3, oligonucleótido (sentido, brazo espaciador 9xT antes de la secuencia); Am, enlace amino. Un par de ácido nucleico en paréntesis, tal como por ejemplo (T/C) en Hsv-fw, significa que hay una variación de ácido nucleico en los cebadores, p. ej. están disponibles los dos cebadores alternativos en la misma mezcla. GEN, general (oligo para ambos HSVs).

Tabla IV: Cebadores utilizados para la PCR múltiple 2 y oligonucleótidos en la micromatriz.

Género, Nº de registro de GenBank	Oligonucleótidos	Nombre del gen	Secuencias (5' → 3')	Posición
VZV, AY548171	VZV-FW	ADN pol., ORF28	CCATTTTCTCGCCGATTTTA (SEQ ID NO: 6)	48.508 – 48.527
	VZV-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			GCCGCATTTGAACGTTTTAT (SEQ ID NO: 7)	48.670 – 48.651
	VZV-T3		Am-TTTTTTTTTACCTCGTACGCTTTTTG (espaciador + SEQ ID NO: 8)	48.597 – 48.613
	VZV1-T3		Am-TTTTTTTTTAGAAATCCGTATCTCCATATA (SEQ ID NO: 28)	48.569 – 48.588
	VZV2-T3		Am-TTTTTTTTTCAGAATCCGTATCTCCATAT (SEQ ID NO: 29)	48.568 – 48.587
CMV, AY446894	CMV-FW	ADN pol., UL44	GTACAACAGCGTGTCGTGCT (SEQ ID NO: 9)	57.044 – 57.063
	CMV-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			CACCGGCCATCAAGTTTATC (SEQ ID NO: 10)	57.240 – 57.221
	CMV-T3		Am-TTTTTTTTTGTAGAAGTTCTTCAGCTGC (espaciador + SEQ ID NO: 11)	57.122 – 57.140
EBV, AJ507799	EBV-FW	ADN pol., BALF5	CGTAGATGACTCGAAGCTG (SEQ ID NO: 12)	154.029 – 154.047
	EBV-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	

ES 2 608 952 T3

Género, Nº de registro de GenBank	Oligonucleótidos	Nombre del gen	Secuencias (5' → 3')	Posición
			ACCATCCTCGACAAGCAG (SEQ ID NO: 13)	154.278 – 154.261
	EBV-T3		Am-TTTTTTTTTGAGAGGCAGGGAAAGAGG (espaciador + SEQ ID NO: 14)	154.184 – 154.201
HHV-6A, X83413	HHV-6-FW	ADN pol., U38	CTCGATCGAATCCGTAACA (SEQ ID NO: 15)	59.289 – 59.308
	HHV-6-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			CCGCGTATGTTTTATCGAGAC (SEQ ID NO: 16)	59.444 – 59.424
	HHV-6A-T3		Am-TTTTTTTTTATCCTTGGACCGAGCTA (espaciador + SEQ ID NO: 17)	59.361 – 59.377
HHV-6B, AF157706	HHV-6-FW	ADN pol., U38	CTCGATCGAATCCGTAACA (SEQ ID NO: 15)	60.409 – 60.428
	HHV-6-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			CCGCGTATGTTTTATCGAGAC (SEQ ID NO: 16)	60.564 – 60.544
	HHV-6B-T3		Am-TTTTTTTTTATCCTTGGACCGAACTC (espaciador + SEQ ID NO: 18)	60.481 – 60.497
HHV-7, AF037218	HHV-7-FW	ADN pol., U38	AGGTCCAACATGCACAGTGA (SEQ ID NO: 19)	56.787 – 56.806
	HHV-7-RV		AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA (SEQ ID NO: 2)	
			GGCAAAGAAAATGTGGGCTA (SEQ ID NO: 20)	56.933 – 56.974
	HHV-7-T3		Am-TTTTTTTTTGGATACAACTTTGGAA (espaciador + SEQ ID NO: 21)	56.893 – 56.909

FW, cebador directo (sentido); RV, cebador inverso (antisentido, secuencia del promotor de la ARN polimerasa T3 AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA antes de la secuencia del virus); T3, oligonucleótido (sentido, brazo espaciador 9xT antes de la secuencia); Am, enlace amino.

5 Amplificación mediante PCR múltiple

Se utilizó la PCR múltiple 1 para identificar HSVs dando como resultado un amplicón de 264 pb y un amplicón de 249 pb en el método alternativo. La PCR múltiple 2 contenía pares de cebadores para la amplificación de CMV, EBV, VZV, HHV-6A, -6B y -7 dando como resultado amplicones de 220 pb, 273 pb, 186 pb, 179 pb (ambos HHV-6A y -6B) y 230 pb, respectivamente. Se realizaron ambas PCRs múltiples para cada muestra.

10 La PCR múltiple 1 se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 0,01% (peso/volumen) de gelatina, 0,2 mM de dNTPmix (Finnzymes, Espoo, Finlandia), 0,6 µM de cebadores, 12,5 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 2 mM de MgCl₂.

15 La PCR múltiple 2 se realizó en un volumen final de 53 µl que contenía 47,2 mM de KCl, 9,4 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 0,009% (peso/volumen) de gelatina, 0,19 mM de dNTPmix (Finnzymes), 0,56 µM de cada cebador, 12,5 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) y 1,9 mM de MgCl₂. La amplificación consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 96°C durante 10 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 20 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

PCRs en diagnósticos rutinarios

5 Para nuestros diagnósticos rutinarios se utilizaron dos PCRs cuantitativas en tiempo real (qPCRs) para CMV y EBV, y tres PCRs cualitativas para HSVs, HHV-6, y VZV. Para los especímenes clínicos se realizaron en paralelo una de estas PCRs y el método basado en micromatriz utilizando ADN de la misma extracción y se compararon los resultados cualitativamente. La elección de la PCR de diagnóstico utilizada se basó en el resultado primario del ensayo diagnóstico y en la información clínica.

10 Se realizaron qPCRs para CMV y EBV de acuerdo con Piiparinen *et al.* (2004) y una modificación de Aalto *et al.* (2003), respectivamente. En la última, se utilizaron los cebadores de EBV y la sonda diseñados por Kimura *et al.* (1999). La PCR para HSVs se realizó de acuerdo con Piiparinen *et al.* (1991) utilizando las sondas dadas a conocer por Vesanen *et al.* (1996). La PCR para HHV-6 se realizó usando los cebadores diseñados por Gopal (1990) y la sonda de HHV-6 descrita por Pitkäranta *et al.* (2000). La PCR para VZV se realizó de acuerdo con Echevarria *et al.* (1994) y Koskiniemi *et al.* (1997). Se utilizó hibridación en microplaca con detección luminométrica (Vesanen *et al.*, 1996) para la detección de productos de PCR cualitativa.

Preparación de la micromatriz

15 Se activaron portaobjetos de microscopio de cristal tal y como se describió en Guo *et al.* (1994) con modificaciones de acuerdo con Pastinien *et al.* (2000). Se realizaron los puntos sonda de oligonucleótidos modificados con NH₂ (Prologo, Paris, Francia) en las placas utilizando un preparador de micromatrices (OmniGrid®, GeneMachines, Huntingdon, R.U.). La matriz consistió en una matriz 5x12 que incluía ocho oligonucleótidos para herpesvirus (Tabla III y IV) y seis oligonucleótidos con secuencias inespecíficas para virus. Los portaobjetos recubiertos contenían 50 matrices en las que se realizaron los puntos sonda de los oligonucleótidos específicos de herpesvirus en 2xtriplicado y los oligonucleótidos inespecíficos que funcionan como controles de hibridación negativos dos veces por matriz. La disolución para realizar los puntos sonda contenía 20 µM de oligonucleótidos y 0,3 M de tampón de carbonato de sodio (pH 9,0) o alternativamente la disolución comercial de realizar puntos sonda al 1x (MSS, ArrayIt, Telechem International, Sunnyvale, CA) en un volumen final de 10 µl. Se realizaron los puntos sonda de oligonucleótidos a temperatura ambiente y 50% de humedad. Los portaobjetos se guardaron durante toda la noche a temperatura ambiente antes del uso.

Transcripción de ARN *in vitro* y reacciones de micromatriz

30 Se juntaron dos productos de PCR múltiple antes de la transcripción en ARN de cadena simple utilizando AmpliScribe™ T3 High Yield Transcription Kit (Epicentre, Madison, WI) o alternativamente AmpliScribe™ T3 Flash Transcription Kit, 1h 42°C) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron controles negativos de las extracciones, PCRs múltiples y PCRs.

35 Se utilizó Mini Pap Pen (Zymed, South Francisco, CA) para rodear el área de la matriz. La disolución de ARN de cadena simple que contenía 6 µl de ARN de cadena simple y 1,5 mM de NaCl en un volumen final de 8,5 µl se calentó a 95°C durante 1,5 minutos y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 42°C con la matriz. Alternativamente, se calentaron los 6 µl de ARN de cadena simple a 96°C durante 2 minutos. Tras el calentamiento, la disolución de ARN de cadena simple que contenía 6 µl de ARN de cadena simple y 1,5 mM de NaCl en un volumen final de 8,5 µl se dejó reaccionar durante 20 minutos a 42°C con la matriz. Tras la incubación se lavaron las micromatrices con tampón de lavado de matriz [0,5xTE (5 mM de Tris, 0,5 mM de EDTA), 0,3 M de NaCl y 0,1% Triton X-100 (YA Kemia, Helsinki, Finlandia)] y agua estéril.

40 Se añadió la disolución de extensión de cebador en un volumen final de 4,5 µl que contenía 55 mM de Tris-HCl, 11 mM de MgCl₂, 83 mM de KCl, 11 mM de DTT (Epicentre), 0,6 µM de dATP, dGTP, ddATP, ddGTP, dUTP-CY5 y dCTP-CY5 (Amersham Bioscience, Little Chalfont, R.U.), 5 U de transcriptasa reversa MMLV (Epicentre) y 0,5 M de trealosa (Sigma-Aldrich) y 8,3% de glicerol (MP Biomedicals, Irvine, CA) y se dejó reaccionar durante 20 minutos a 52°C. Antes de escanear la fluorescencia, las micromatrices se lavaron con tampón de lavado de matrices y se secaron.

Escaneado y análisis de la micromatriz

50 Las micromatrices se analizaron utilizando un escáner ScanArray Express, y software ScanArray™ y QuantArray™ (PerkinElmer, Wellesley, MA). El valor de corte del análisis se determinó para cada matriz por separado. Se comparó la señal del punto del oligonucleótido (menos la señal de fondo local) con señales de oligonucleótidos inespecíficos. Se consideraron positivas las señales al menos tres veces mayores. Se realizó la micromatriz por duplicado. El número de señales cuantificadas no se correlacionaron con el número de virus en los especímenes.

Sensibilidad analítica

55 Las PCRs múltiples proporcionaron buenas sensibilidades analíticas (Tabla V) que se obtuvieron estudiando diluciones de los controles comerciales de cada herpesvirus al menos tres veces. Los controles de agua de las extracciones y PCRs múltiples fueron negativos mediante micromatriz. No se observaron otras reacciones cruzadas además de las observadas entre HHV-6A y -6B. Se observaron reacciones cruzadas entre genotipo-oligonucleótidos

específicos a más de 10.000 copias de HHV-6B/reacción. En altas concentraciones de HHV-6A, sin embargo, no se detectaron reacciones cruzadas. Los controles comerciales funcionaron adecuadamente en la detección (Fig. 1) y además mostraron la precisión de la hibridación.

TABLA V. Sensibilidades de las PCRs múltiples y micromatriz utilizando controles comerciales de ADN vírico.

Virus	Sensibilidades de las PCRs múltiples por reacción	Sensibilidad de la micromatriz por reacción
HSV-1	9,1 VPs o 30 copias*	9,1 VPs o 5 copias*
HSV-2	8,0 VPs o 30 copias*	8,0 VPs o 5 copias*
CMV	3,5 copias	1,0 copias
EBV	10,0 copias	3,0 copias
HHV-7	10,0 copias	3,0 copias
HHV-6A	29,0 copias	7,0 copias
HHB-6B	22,0 VPs	2,5 copias
VZV	11,0 VPs o 10 copias*	4,5 VPs o 7,5 copias*

5

VPs, partículas víricas. Las sensibilidades de las PCRs múltiples se definieron mediante un gel de electroforesis al 2% que es menos sensible que los métodos de hibridación. * indica un resultado recibido por el método, oligonucleótidos y/o cebadores alternativos.

Análisis de especímenes clínicos y especificidad

10 Se analizaron simultáneamente 116 especímenes en total utilizando una de las PCRs de diagnóstico y la micromatriz. Se realizó qPCR para CMV o EBV para 73 muestras de plasma y PCR cualitativa para HHV-6 para 10 muestras de sangre completa (Tabla VI). Se realizó PCR cualitativa para HSV o VZV para 23 CSFs (Tabla VII). Se analizaron diez especímenes de ensayos de aptitud (Tabla VIII) con PCR cuantitativa para HSV y VZV. Para 103 de los 116 (89%) especímenes clínicos, las PCRs y la micromatriz dieron resultados cualitativos concordantes.

15 TABLA VI. Resultados de la PCR de diagnóstico rutinaria y de la micromatriz para especímenes de plasma y de sangre completa.

Resultado de la PCR (número de especímenes)	Resultado de la micromatriz (número de especímenes)
neg (32)	neg (28)
	CMV (1)
	EBV (1)
	HHV-6B (2)
CMV (26)	CMV (22)
	CMV y EBV (2)
	neg (2)
EBV (15)	EBV (12)
	EBV y CMV (1)
	EBV y HHV-7 (1)
	neg (1)
*HHV-6 (10)	HHV-6B (5)
	HHV-6B y EBV (2)

Resultado de la PCR (número de especímenes)	¹ Resultado de la micromatriz (número de especímenes)
	HHV-6B y HHV-7 (2)
	neg (1)

neg. negativo. Los especímenes se almacenaron a -70°C.

* especímenes de sangre completa

¹ PCRs múltiples detectadas mediante la micromatriz.

5 De los 32 especímenes de plasma negativos mediante PCR, la micromatriz fue negativa en 28 (Tabla VI). Cuatro especímenes de plasma originalmente negativos mostraron resultados positivos con la micromatriz. En 24/26 especímenes de plasma positivos, la qPCR y la micromatriz dieron resultados concordantes. Dos muestras positivas para CMV mediante qPCR, 1.280 y 810 genomas equivalentes (GEq) por ml, fueron negativas mediante micromatriz. Se observaron dos infecciones dobles de CMV y EBV entre casos positivos para CMV (5.420 GEq/ml para CMV y 6.280 para EBV, y 4.200 para CMV y 4.130 para EBV, respectivamente).

10 Se detectó EBV mediante micromatriz en todas las 15 muestras positivas para EBV mediante PCR excepto en una. El espécimen fallado dio 860 GEq/ml en qPCR. Se detectaron dos infecciones dobles (EBV-CMV y EBV-HHV-7) mediante micromatriz. Los especímenes tenían 15×10^6 y 990 GEq/ml de EBV mediante qPCR, respectivamente.

15 Para 9 de los 10 especímenes positivos para HHV-6 mediante PCR, se detectó HHV-6B mediante micromatriz. La micromatriz también detectó cuatro infecciones dobles; dos fueron infecciones HHV-6B-EBV, y la otra una infección HHV-6B-HHV-7.

20 En total 10/23 muestras de CSF fueron negativas y 13/23 positivas mediante PCR. Todos los CSFs negativos mediante PCR fueron negativos en la micromatriz. De tres especímenes positivos para HSV, la micromatriz falló en una muestra positiva para HSV-2. Se observó una infección triple (HSV-2, HHV-7 y HHV-6B) mediante micromatriz. Ambas muestras positivas para HHV-6 fueron negativas, mientras todas las 8 muestras positivas para VZV fueron positivas también mediante micromatriz (Tabla VII).

TABLA VII. Resultados de la PCR de diagnóstico rutinaria y la micromatriz para especímenes de CSF*.

Resultado de la PCR (número de especímenes)	Resultado de la micromatriz (número de especímenes)
neg (10)	neg (10)
HHV-6 (2)	neg (2)
HSV-1 (1)	HSV-1 (1)
HSV-2 (3)	HSV-2, HHV-7 y HHV-6B (1)
	neg (1)
VZV (8)	VZV (6)
	VZV y HHV-6B (1)
	VZV y EBV (1)

neg, negativo. Especímenes almacenados a -70°C.

25 Dos de los 10 especímenes de ensayo de aptitud fueron negativos mediante PCR y micromatriz. De ocho especímenes positivos mediante PCR, dos fueron positivos para HSV-1, dos para HSV-2 y cuatro para VZV, tal y como se había informado previamente por el QCMD. La micromatriz fue negativa en uno de los positivos para HSV-1 y -2 mediante PCR, aparte de esto los resultados fueron concordantes. En una muestra positiva para VZV se observó una señal muy débil para HHV-6B en la micromatriz además de la señal de VZV (Tabla VII-).

El panel negativo para herpesvirus (70 muestras de suero, 30 de CSF y 11 de ensayos de aptitud) fue negativo en las PCRs múltiples y la micromatriz. Por tanto, la especificidad fue del 100% (resultados no incluidos en las tablas).

30 TABLA VIII. Resultados de la PCR de diagnóstico rutinaria y la micromatriz para especímenes de QCMD.

Resultado de la PCR (número de especímenes)	Resultado de la micromatriz (número de especímenes)
neg (2)	neg (2)

Resultado de la PCR (número de especímenes)	Resultado de la micromatriz (número de especímenes)
HSV-1 (2)	HSV-1 (1)
	neg (1)
HSV-2 (2)	HSV-2 (1)
	neg (1)
VZV (4)	VZV (3)
	VZV y HHV-6B (1)

neg, negativo.

Referencias

Aalto SM, Juvonen E, Tarkkanen J, Volin L, Ruutu T, Mattila PS, Piiparinen H, Knuutila S, Hedman K. Lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation – pre-emptive diagnosis by quantification of Epstein-Barr virus DNA in serum. *J. Clin. Virol.* 2003;28:275-83.

Aberle SW, Puchhammer-Stockl E. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2002;1:S79-85.

Akhtar et al. PCR diagnosis of viral pneumonitis from fixed-lung tissue in children. *Biochemical and Molecular Medicine* 1996; 58:66-76.

Aurelius E, Johansson B, Sköldenberg B, Staland A, Forsgren M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1991;337:189-92.

Boriskin YS, Rice PS, Stabler RA, Hinds J, Al-Ghusein H, Vass K, Butcher PD. DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous system infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5811-8.

Borsting C, Sanchez JJ, Morling N. Multiplex PCR, amplicon size and hybridization efficiency on the NanoChip electronic microarray. *Int. J. Legal Med.* 2004;118:75-82.

Boutolleau D, Fernandez C, Andre E, Imbert-Marcille BM, Milpied N, Agut H, Gautheret-Dejean A. Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with

- different infection profiles in stem cell transplantation recipients. *J. Infect. Dis.* 2003;187:179-86.
- Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J. Infect. Dis.* 1998;178:1250-6.
- Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:2398-407.
- Druce J, Catton M, Chibo D, Minerds K, Tyssen D, Kostecki R, Maskill B, Leong-Shaw W, Gerrard M, Birch C. Utility of a multiplex PCR assay for detecting herpesvirus DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:1728-32.
- Dockrell DH, Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev. Med. Virol.* 2001;11:23-36.
- Echevarria JM, Casas I, Tenorio A, de Ory F, Martinez-Martin P. Detection of varicella-zoster virus-specific DNA sequences in cerebrospinal fluid from patients with acute aseptic meningitis and no cutaneous lesions. *J. Med. Virol.* 1994;43:331-5.
- Espy MJ, Teo R, Ross TK, Svien KA, Wold AD, Uhl JR, Smith TF. Diagnosis of varicella-zoster virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:3187-9.
- Földes-Papp Z, Egerer R, Birch-Hirschfeld E, Striebel H-M, Demel U, Tolz G P and Wutzler P. Detection of multiple human herpes viruses by DNA microarray technology. *Mol Diagn* 2004; 8(1):1-9.
- Gemignani F, Landi S, Chabrier A, Smet A, Zehbe I, Canzian F, Tommasino M. Generation of a DNA microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. *J. Virol. Methods* 2004;119:95-102.
- Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, Tedder RS, Honess RW. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. *Lancet* 1990;335:1598-9.
- Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:5456-65.

Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt RJ, Corre I, Garand R, Neves AM, Bataille R, Casey JW. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 2003;17:185-95.

Huber M, Mundlein A, Dornstauder E, Schneeberger C, Tempfer CB, Mueller MW, Schmidt WM. Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays. *Anal. Biochem.* 2002;303:25-33.

Hudnall SD, Chen T, Tyring SK. Species identification of all eight human herpesviruses with a single nested PCR assay. *J. Virol. Methods* 2004;116:19-26.

Ihira M, Yoshikawa T, Ishii J, Nomura M, Hishida H, Ohashi M, Enomoto Y, Suga S, Iida K, Saito Y, Nishiyama Y, Asano Y. Serological examination of human herpesvirus 6 and 7 in patients with coronary artery disease. *J. Med. Virol.* 2002;67:534-7.

Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, Matsuyama T, Morishima T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:132-6.

Koskiniemi M, Mannonen L, Kallio A, Vaheri A. Luminometric microplate hybridization for detection of varicella-zoster virus PCR product from cerebrospinal fluid. *J. Virol. Methods* 1997;63:71-9.

Koskiniemi M, Piiparinen H, Rantalaiho T, Eränko P, Färkkilä M, Rähkä K, Salonen EM, Ukkonen P, Vaheri A. Acute central nervous system complications in varicella zoster virus infections. *J. Clin. Virol.* 2002;25:293-301.

Lindroos K, Liljedahl U, Raitio M, Syvanen AC. Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jul 1;29(13):E69-9.

Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvänen AC. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res.* 2000;10:1031-42.

- Piiparinen H, Vaheri A. Genotyping of herpes simplex viruses by polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 1991;119:275-283.
- Piiparinen H, Höckerstedt K, Lappalainen M, Suni J, Lautenschlager I. Monitoring of viral load by quantitative plasma PCR during active cytomegalovirus infection of individual liver transplant patients. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:2945-52.
- Piiparinen H, Höckerstedt K, Grönhagen-Riska C, Lautenschlager I. Comparison of two quantitative CMV PCR tests, Cobas Amplicor CMV Monitor and TaqMan assay, and pp65-antigenemia assay in the determination of viral loads from peripheral blood of organ transplant patients. *J. Clin. Virol.* 2004;30:258-66.
- Pitkäranta A, Piiparinen H, Mannonen L, Vesaluoma M, Vaheri A. Detection of human herpesvirus 6 and varicella-zoster virus in tear fluid of patients with Bell's palsy by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:2753-5.
- Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37:1352-5.
- Read SJ, Mitchell JL, Fink CG. LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:3056-9.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:365-86.
- Safronetz D, Humar, A, Tipples, G A. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B, and by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2003, 112:99-105.
- Schirm J, J. J. Meulenbergg JJ, Pastoor GW, van Voorst Vader PC, Schroder FP. Rapid detection of varicella-zoster virus in clinical specimens using monoclonal antibodies on shell vials and smears. *J. Med. Virol.* 1989;28:1-6.
- Sengupta S, Onodera K, Lai A, Melcher U. Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:4542-50.
- Striebel H-M, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Földes-Papp Z, Tilz G P, Stelzner A. Enhancing sensitivity of human herpes virus diagnosis with DANN microarrays using dendrimers 2004;77:89-97
- Suga S, Yoshikawa T, Nagai T, Asano Y. Clinical features and virological findings in children with primary human herpesvirus 7 infection. *Pediatrics* 1997;99:E4.

Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. 1994. Human herpesvirus 7: another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J. Pediatr.* 1994;125:1-5.

Van den Veyver et al. Detection of intrauterine viral infection using the polymerase chain reaction. *Molecular Genetics and Metabolism* 1998; 63:85-95.

Vesonen M, Piiparinen H, Kallio A, Vaheri A. Detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid samples using the polymerase chain reaction and microplate hybridization. *J. Virol. Methods* 1996;59:1-11.

Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, Rasooly A. Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:4071-80.

Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:15687-92.

Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;13:3406-3415.

Yamamoto T, Nakamura, Y. A single tube PCR assay for simultaneous amplification of HSV-1/-2, VZV, CMV, HHV-6A/-6B, and EBV DNAs in cerebrospinal fluid from patients with virus-related neurological diseases. *Journal of NeuroVirology* 2000; 6:410-

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Licentia Ltd.
- 5 <120> Método y micromatriz para detectar herpesvirus
<130> LIC13PCT
- 10 <150> 60/788,307
<151>31-03- 2006
<160> 29
<170> PatentIn versión 3.4
- 15 <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
- 20 <220>
<223> cebador directo
- 25 <400> 1
aaggaggcgc ccaagcgccc g 21
- 30 <210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Secuencia del promotor de la ARN polimerasa T3
- 35 <400> 2
aattaaccct cactaaaggg aga 23
- 40 <210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> cebador inverso
- 45 <400> 3
tgggtacag gctggcaaag t 21
- 50 <210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> oligonucleótido
- 55 <400> 4
gtccttgacc ccactt 16
- 60 <210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 5 <400> 5
 aggataagga cgacgac 17

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 15 <400> 6
 ccattttctc gccgatttta 20

 <210> 7
 <211> 20
 20 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso
 25
 <400> 7
 gccgcatttg aacgtttat 20

 <210> 8
 30 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 8
 acctcgtagc cttttg 17

 40 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 9
 50 gtacaacagc gtgtcgtgct 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 10
 60 caccggccat caagtttat 20

 <210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 11
 5 gtagaagttc ttcagctgc 19

 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 12
 15 cgtagatgac tcgaagctg 19

 <210> 13
 <211> 18
 <212> DNA
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 13
 25 accatcctcg acaagcag 18

 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 14
 35 gagaggcagg gaaagagg 18

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo

 <400> 15
 45 ctcgatcgaa tccgtaaaca 20

 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso

 <400> 16
 55 ccgctatgt ttatcgaga c 21

 <210> 17
 <211> 17
 <212> DNA
 60 <213> Artificial

 65

<220>
 <223> oligonucleótido

 5 <400> 17
 atccttgac cgagcta 17

 <210> 18
 <211> 17
 <212> DNA
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 18
 atccttgac cgaactc 17

 <210> 19
 <211> 20
 20 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador directo
 25
 <400> 19
 aggtccaaca tgcacagtga 20

 <210> 20
 <211> 20
 30 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador inverso
 35
 <400> 20
 ggcaaagaaa atgtgggcta 20

 <210> 21
 <211> 17
 40 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 21
 50 ggatacaaac tttggaa 17

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador directo; N es T o C

 <400> 22
 60 agcgaattcg agatgctgnt 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso; N es T o G

5 <400> 23
 ccttnatctt gctgcgcttc 20

10 <210> 24
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> oligonucleótido

15 <400> 24
 caagctgacg gacatt 16

20 <210> 25
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> oligonucleótido

25 <400> 25
 caagctgacg gagatc 16

30 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido

35 <400> 26
 ggtacaacat catcaacttc 20

40 <210> 27
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido

50 <400> 27
 gggacatagg ccagag 16

55 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido

60 <400> 28
 agaatccgta tctccatata 20

65 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

ES 2 608 952 T3

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 29

5 cagaatccgt atctccatat 20

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar uno o más herpesvirus en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- extraer ADN de la muestra biológica;
- amplificar el ADN extraído;

- 5
- traducir el ADN amplificado a ARN de cadena simple;
 - hibridar ARN de cadena simple con secuencias de oligonucleótidos en una micromatriz, correspondiéndose dichas secuencias de oligonucleótidos con cada uno de los herpesvirus que han de ser detectados;
 - extender el ARN de cadena simple hibridado mediante el método de extensión de cebador en presencia de nucleótidos detectables;

- 10
- detectar una señal de los nucleótidos detectables mediante un método apropiado;

en donde la longitud de la secuencia de oligonucleótidos es menor que 50 nucleótidos y la secuencia comprende una secuencia en dirección 5' a 3' seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, o una secuencia que carece de un nucleótido, que tiene un nucleótido adicional, o que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos comparada con las secuencias SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 o SEQ ID NO: 29.

- 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la micromatriz comprende oligonucleótidos que se corresponden con al menos dos herpesvirus diferentes, preferiblemente al menos tres herpesvirus diferentes.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la micromatriz comprende oligonucleótidos que se corresponden con herpesvirus seleccionados del grupo que comprende

HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV, HHV-6A, HHV-6B y HHV-7.

- 20
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la detección de herpesvirus diferentes es simultánea.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además la detección de otros patógenos, preferiblemente virus.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además la detección de enfermedades del sistema nervioso central (CNS) o enfermedades de inmunodeficiencia.

- 30
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método comprende además la detección de enterovirus de borrelia.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la detección de herpesvirus diferentes y otros patógenos o enfermedades es simultánea.

- 35
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la amplificación del ADN se realiza mediante el uso de un par de cebadores que comprenden cebador A y cebador B seleccionados del grupo que comprende

A es SEQ ID NO: 22 y B es SEQ ID NO: 23,

A es SEQ ID NO: 6 y B es SEQ ID NO: 7;

A es SEQ ID NO: 9 y B es SEQ ID NO: 10;

- 40
- A es SEQ ID NO: 15 y B es SEQ ID NO: 16, y

A es SEQ ID NO: 19 y B es SEQ ID NO: 20,

o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con las secuencias mencionadas.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la amplificación del ADN se realiza mediante PCR múltiple en dos reacciones.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde HSV-1 y HSV-2 se amplifican en una reacción y CMV, EBV, VZV, HHV-6A, HHV-6B y HHV-7 se amplifican en otra reacción.
12. Una micromatriz para detectar herpesvirus, que comprende
- un soporte sólido que comprende al menos una matriz;
- 5 - comprendiendo dicha matriz oligonucleótidos específicos para al menos un herpesvirus, en donde la longitud de la secuencia de oligonucleótidos es menor que 50 nucleótidos y la secuencia comprende una secuencia en dirección 5' a 3' seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, o una secuencia que carece de un nucleótido, que tiene un nucleótido adicional, o que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos comparada con las secuencias SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.
- 10 13. La micromatriz de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el número de matrices en el soporte sólido es 1 a 80, preferiblemente 10 a 60.
14. La micromatriz de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde el número de puntos sonda de oligonucleótidos en una micromatriz es 4 a 200, preferiblemente 10 a 100.
- 15 15. La micromatriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde se utiliza la micromatriz para detectar un herpesvirus seleccionado del grupo que comprende
- HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV, HHV-6A, HHV-6B y HHV-7.
16. La micromatriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la micromatriz comprende oligonucleótidos para detectar más enfermedades que aquellas causadas por herpesvirus, tales como enfermedades del sistema nervioso central (CNS) o enfermedades de inmunodeficiencia, u oligonucleótidos para detectar otros patógenos, preferiblemente virus.
- 20 17. La micromatriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en donde la micromatriz comprende oligonucleótidos para detectar otros patógenos tales como enterovirus o patógenos que causan borreliosis.
18. Un kit que comprende la micromatriz de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 y opcionalmente, cebadores, tampones, enzimas y/o nucleótidos.
- 25 19. Un método para preparar una micromatriz para detectar herpesvirus, que comprende
- unir a una matriz oligonucleótidos que se corresponden con al menos un herpesvirus;
 - multiplicar las matrices en un portaobjetos, correspondiéndose el número de las matrices con el número de muestras a analizar.
- 30 en donde la longitud de la secuencia de oligonucleótidos es menor que 50 nucleótidos y la secuencia comprende una secuencia en dirección 5' a 3' seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, o una secuencia que carece de un nucleótido, que tiene un nucleótido adicional, o que tiene un cambio en la secuencia de nucleótidos comparada con las secuencias SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.
- 35 20. Un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, y SEQ ID NO: 27, en donde la longitud de la secuencia de oligonucleótidos es menor que 50 nucleótidos y la secuencia comprende la secuencia mencionada en dirección 5' a 3'.
- 40 21. Un par de cebadores que consiste en un cebador A que comprende SEQ ID NO: 22 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 23 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con las secuencias mencionadas.
22. Un conjunto de pares de cebadores múltiples que comprende un par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 21 y uno o más pares de cebadores adicionales seleccionados del grupo que consiste en
- un par de cebadores con un cebador A que comprende SEQ ID NO: 6 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 7,
- 45 un par de cebadores con un cebador A que comprende SEQ ID NO: 9 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 10,
- un par de cebadores con un cebador A que comprende SEQ ID NO: 12 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 13,

un par de cebadores con un cebador A que comprende SEQ ID NO: 15 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 16, y

un par de cebadores con un cebador A que comprende SEQ ID NO: 19 y un cebador B que comprende SEQ ID NO: 20,

5 comprendiendo dichos pares de cebadores secuencias que tienen al menos 95% de identidad con las secuencias mencionadas.

23. Un conjunto de pares de cebadores múltiples que comprenden todos los pares de cebadores descritos en la reivindicación 22.

10 24. Un método para detectar al menos dos virus del herpes simultáneamente en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- extraer ADN de una muestra biológica;

- amplificar el ADN extraído;

- traducir el ADN amplificado a ARN de cadena simple;

15 - hibridar ARN de cadena simple con secuencias de oligonucleótidos en una placa de micromatriz, correspondiéndose dichas secuencias de oligonucleótidos con herpesvirus que causan comúnmente infecciones simultáneas;

- extender el ARN de cadena simple hibridado mediante el método de extensión de cebador en presencia de nucleótidos detectables; y

- detectar una señal de los nucleótidos detectables mediante un método adecuado.

20

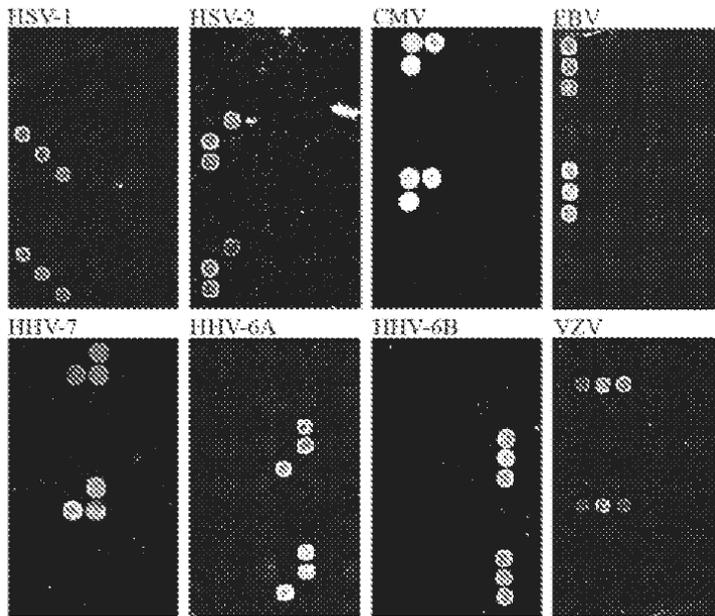


Fig. 1